

烷化剂 NTG 诱变虾青素产生菌红法夫酵母的研究

吴 江 刘子贻 朱寿民

(浙江大学医学院生物化学教研室 杭州 310031)

摘要: 虾青素是一种很有效的生物抗氧化剂和某些生物的天然着色剂,应用前景广阔。红法夫酵母是生产虾青素的一个来源,优点颇多。天然菌株虾青素产量较少,缺少实用价值。实验采用烷化剂 NTG 诱变红法夫酵母,筛选出类胡萝卜素产量高的诱变株。用薄层层析对红法夫酵母产生的色素及其皂化产物进行分析,并对各个成分的扫描光谱进行了比较。认为红法夫酵母产生的类胡萝卜素成分主要是虾青素及虾青素二酯,还有一部分 β -胡萝卜素。同时,还对虾青素产生的时相和 BHT 对虾青素光分解的保护作用进行了初步研究。

关键词: 红法夫酵母, 虾青素, N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍, 诱变

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2001)02-0033-05

STUDY ON THE ASTAXANTHIN-PRODUCING YEAST *PHAFFIA RHODOZYMA* MUTATED BY NTG

WU Jiang LIU Zi-Yi ZHU Shou-Min

(Department of Biochemistry, Medical college of Zhejiang University, Hangzhou 310031)

Abstract: astaxanthin is an effective antioxidant and natural pigment which has wide application. *Phaffia rhodozyma* is a good source of astaxanthin, but wild strain has limited use in industry because of low production level of astaxanthin. Several mutants of *Phaffia rhodozyma* were obtained by exerting mutagen N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. The growth curve suggested that pigments were mainly produced in the middle and latter periods of log phase. The pigments were extracted from *Phaffia rhodozyma* and analysed by esterification, thin layer chromatography and absorption spectrometry. It was proved that astaxanthin, astaxanthin diester and β -carotene were the major components of the pigments produced by *Phaffia rhodozyma*. We also studied the pigments producing phase of *Phaffia rhodozyma*. and founded that astaxanthin was stable to light under butylated

hydroxytoluene coexistence.

Key words: *Phaffia rhodozyma*, Astaxanthin, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, Mutation

虾青素(astaxanthin), 全称为 3,3'-二羟基- β,β -胡萝卜素-4,4'-二酮。虾青素是类胡萝卜素合成的终点, 在自然界广泛存在。它具有很强的着色功能, 能使鱼类的皮肤和肌肉、家禽的羽毛、爪、喙及蛋呈现鲜艳的色泽。此外, 虾青素还有许多有待进一步研究的生理功能。与 β -胡萝卜素相比, 虾青素促进抗体产生、淬灭自由基的能力更强^[1]。在动物实验中已证实虾青素具有一定的抗癌、调节免疫功能、防止紫外线对皮肤的伤害、预防视网膜黄斑变性等作用。目前, 虾青素主要用作饲料添加剂, 不但能使鱼类皮肤着色, 还能促进鱼类的生长繁殖, 增强抗病能力。由于虾青素具有较强的抗氧化能力, 它本身及其氧化产物虾红素都有鲜艳的色泽, 因此它作为化妆品用色素和食品添加剂也有一定的开发价值。

目前, 虾青素有 3 个来源。一是人工合成, 合成的成本很高, 而且越来越多的国家限制合成色素的使用。二是从虾蟹壳中提取, 虾蟹壳中虾青素含量低而且不稳定, 提取工艺污染较大, 成本也较高。三是用真菌和藻类发酵生产, 如红法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)、绿雨生红球藻(*Haematococcus*)等。红法夫酵母是目前常用于生产虾青素的真菌, 属于异担孢子菌(*Heterobasidiomycetous*)。它的发酵周期短, 生产成本低, 适宜工业化生产。而且它含有丰富的蛋白、脂类和维生素, 破壁处理后可以直接添加到饲料当中^[2]。因此研究红法夫酵母生产虾青素具有很广阔的前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 红法夫酵母系本实验室保藏菌种, 命名为 LW。

1.1.2 仪器: LRH-25A 生物培养箱, LZB-10 玻璃转子流量计, ACO-009D 135W 空气压缩机; 754 分光光度计; Beckman DU-65 分光光度计; LG-3 多用冰冻干燥机。

1.1.3 培养基及试剂: 麦芽汁培养基: 麦芽汁经鸡蛋白去沉淀, 用蒸馏水调比重至 1.038, 自然 pH。产孢培养基: 0.7% 醋酸钠。消泡剂: 普通色拉油。诱变剂: N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)。虾青素标准品, β -胡萝卜素标准品(Sigma 试剂)。抗氧化剂: 二丁基羟基甲苯(BHT)(食用级)。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 诱变及培养方法

1.2.1 诱变方法: 采用烷化剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)对单倍体酵母进行化学诱变。诱变处理过程如下: ①制备单倍体酵母: 酵母在产孢培养基中培养 2d, 离心获得单倍体芽孢。用 pH6.0 磷酸缓冲液将菌体稀释至 4×10^6 个/mL 待用。②诱变: 取 0.5mL NTG(用 pH6.0 磷酸缓冲液配制成浓度为 0.2mg/ml 和 0.4mg/mL)加入试管, 再吸 4×10^6 个/mL 菌液 0.5mL 加入上述试管, 混匀后置 22°C 水浴保温 30min, 并不断摇动试管, 离心弃去上清液终止反应, 用培养液稀释 20 倍, 22°C 水浴过夜, 取菌液在 2% 麦芽汁琼脂培养基上划线, 22°C 培养 10d 后挑选深红色菌落接种于麦芽汁斜面。

1.2.2 培养条件: 原麦芽汁稀释成比重为 1.038, 加 2% 琼脂制成斜面。酵母接种在斜面 22°C 活化 48h, 接种于比重 1.038 麦芽汁中, 通入经棉花柱过滤的空气, 22°C 培养。每 3h 取样, 稀释 20 倍, 测 A_{600nm} 确定生长曲线, 同时观察色素形成时间。

1.3 酵母细胞的破壁与色素提取

湿菌-冰冻-酸-热法破壁;酵母培养至稳定期取 10mL 3000r/min 离心 15min 收获,去离子水洗涤菌体 2 次,另取 10mL 同样处理,105℃ 24h 烘干称重。湿菌置于 -30℃ 冰冻 3h,加 2.5 NHCl,体积约为干重的 15 倍(mL),立即置沸水浴 2.5min,迅速冷却,3000r/min 离心 15min,沉淀用去离子水洗涤 2 次,加少量丙酮多次抽提色素,直至沉淀灰白,合并抽提液,加入含 1% BHT 的石油醚萃取色素,多次用去离子水洗去丙酮,无水硫酸钠脱水并以石油醚定容。

1.4 类胡萝卜素含量的计算

按照 An G-H 的方法计算总类胡萝卜素^[3],石油醚中 $A_{1\%} = 2100$ 。

总类胡萝卜素($\mu\text{g/g}$ 干细胞) = $A_{\text{max}} \times D \times V \times 100 / (21 \times W)$; 式中: A_{max} : 最大吸收波长处的吸光度; D : 稀释倍数; V : 溶剂体积(mL); W : 细胞干重(g)。

1.5 酵母色素的初步分析

1.5.1 薄层层析(TLC)和光吸收扫描:称取硅胶 G 2g 加 0.3% 的羧甲基纤维素钠溶液 7mL 研磨后均匀铺在 7.5cm×15cm 的玻璃板上,室温干燥后 110℃ 活化 1~2h,将色素提取液真空浓缩后用毛细管点样,反式虾青素标准品和 β -胡萝卜素标准品作平行对照,以现配的乙醚,正己烷(7:3)为展开剂,展层后立即计算 R_f 值。薄板展层后在暗箱中晾干,用刀片刮下各色带,加 1mL 氯仿洗脱后离心,取上清用紫外分光光度计作光吸收扫描。

1.5.2 标准虾红素制备和色素的皂化:根据文献[4]的方法,取标准虾青素石油醚溶液加入等体积 1% KOH 甲醇溶液在 80℃ 水浴中回流 60min,4℃ 冰箱放置过夜。取甲醇层得到标准虾红素,用冰醋酸中和至 pH5.0 左右。酵母抽提液按同样方法皂化。

2 结果与讨论

2.1 抗氧化剂 BHT 对虾青素稳定性的影响

虾青素标准品用少量氯仿溶解,加石油醚定容。BHT 以石油醚溶解。按表 1 进行实验:

表 1 含不同浓度 BHT 的虾青素标准液的配制表

试验号	1	2	3	4
BHT	石油醚 5mL	2%BHT 5mL	0.2%BHT 5mL	0.02%BHT 5mL
虾青素标准液	5mL	5mL	5mL	5mL
BHT 终浓度	0	1%	0.1%	0.01%

1~4 号 10mL 样品放在室外阳光下直射,结果见图 1。

此结果表明 BHT 可以明显增强虾青素的光稳定性。未加 BHT 的样品 2h 后虾青素的分解率为 61%,BHT 在 0.01%、0.1% 和 1% 浓度下虾青素的分解率分别为 50%、44% 和 7.9%,说明 BHT 的保护作用随着它的浓度增大而增强。用 Beckman DU-65 分光光度计扫描上表中 1 号和 2 号样品,两者在 360nm~600nm 的光吸收图谱一致,说明 BHT 对虾青素的光吸收无明显影响,因

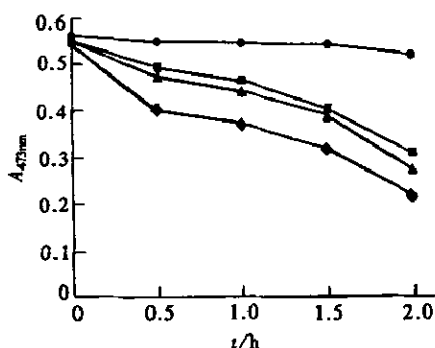


图 1 BHT 对虾青素光稳定性的影响

此虾青素提取时可用 BHT 作为保护剂,使用时采用 1% 的浓度较为适宜。

2.2 生长曲线

红法夫酵母 LW 从斜面转至麦芽汁培养 10h 左右进入对数期,36h 进入平衡期,42h 达到最大生物量。肉眼观发酵液 18h 开始变黄,随后由黄变为粉红,27h 时发酵液呈红色,以后随生物量增加而加深,见图 2。

2.3 诱变结果

酵母经诱变后形成无色、黄色、粉红色和红色的菌落。无色和黄色菌株是不产色素和主要产生 β -胡萝卜素的诱变株。而虾青素及其酯都呈鲜艳的红色,因此挑选红色最深的菌落接种于麦芽汁斜面,命名为 LW-2, LW-3, LW-4。各诱变株用生理盐水稀释后于麦芽汁-琼脂培养基上划线培养,使其形成单个菌落,再挑出深红色的菌落。将这个肉眼筛选过程反复进行数次。然后将 LW 及 3 个诱变株都在麦芽汁中培养,通气量 $0.25\text{m}^3/\text{h}/50\text{mL}$,用冰冻-酸-热法提取色素。重复培养 4 次取平均值,结果见表 2。

表 2 红法夫酵母诱变前后的总类胡萝卜素含量

菌 株	LW	LW-2	LW-3	LW-4
总类胡萝卜素($\mu\text{g/g}$)	132.4	200.0	214.9	150.7

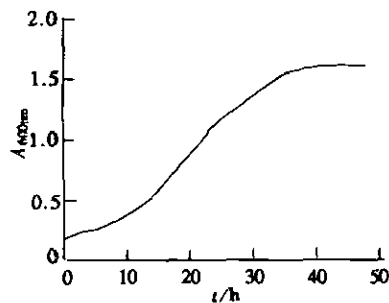


图 2 红法夫酵母在麦芽汁中的生长曲线

经统计分析, $F = 11.164$, $P = 0.00087$, 各组均数差别有统计意义。经数据比较, LW-3 的类胡萝卜素产量最高, 较未诱变的 LW 增长约 62.3%。

2.4 酵母色素的初步分离鉴定

2.4.1 酵母抽提液扫描图谱分析: 用冰冻-酸-热提取法所获抽提液的光吸收扫描图形与虾青素标准品在石油醚中光吸收扫描图形比较如图 3。

由图可见, 酵母抽提物和标准虾青素的光吸收图谱基本相似, λ_{max} 约为 472.5nm。估计所提取的色素中虾青素占主要成分。

2.4.2 酵母色素的初步分离鉴定: LW、LW-2、LW-3、LW-4 的色素提取液真空浓缩后经薄板分离, 结果见图 4。LW-3 提取液皂化后上层为石油醚层, 呈黄色, 下层为甲醇层, 呈红色。分离石油醚和甲醇层, 甲醇层用冻醋酸中和, 两层分别减压浓缩后再经薄板分离, 结果见图 5。未皂化时 4 个菌株的色素在薄板上都可见 4 个斑点。R_f 值分别为 R₁=0.97, R₂=0.80, R₃=0.57, R₄=0.52。第 1 点呈黄色。位置与 β -胡萝卜素标准品相对应; 其氯仿洗脱液的光吸收图形与 β -胡萝卜素标准品吸收峰相似。第 2 点呈红色, 氯仿中吸收峰为 499nm。第 3 点为橙红色, 颜色最深, 含量最大, 与虾青素标准品位置对应, 在氯仿中吸收峰为 489nm, 与虾青素标准品在氯仿中的吸收峰一致。第 4 点呈很淡的橙色, 含量很少, 吸收峰在 459nm、483nm、499nm, 此点极性最大, 新鲜样品中此点比陈旧样品更淡, 可能是虾青素和 β -胡萝卜素的降解产物。皂化处理后石油醚中黄色色素与 β -胡萝卜素标准品对应, R₅=0.97; 甲醇中红色色素与

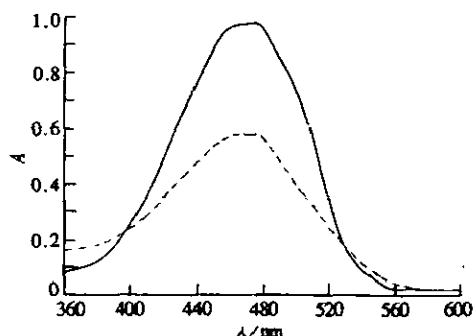


图 3 标准及样品虾青素的扫描图谱
—标准虾青素, ---酵母抽提物

虾红素标准品对应, $R_{f6}=0.78$ 。图 4 上第 2 点和第 3 点皂化后变为一点, 与虾红素标准品对应, 而且 R_{f2} 较大, 说明此色素极性较小, 推测第二点可能是虾青素二酯。因此红法夫酵母色素的主要成分是虾青素及其酯。

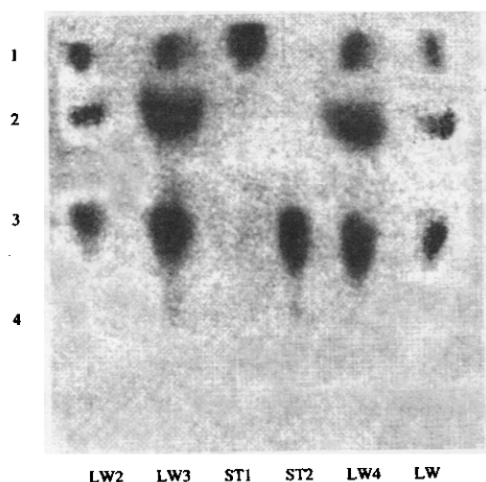


图 4 野生株及各诱变株石油醚抽提液的 TLC 分析

1 LW, 2~4 LW2~4, ST1 β -胡萝卜素标准品,
ST2 虾青素标准品

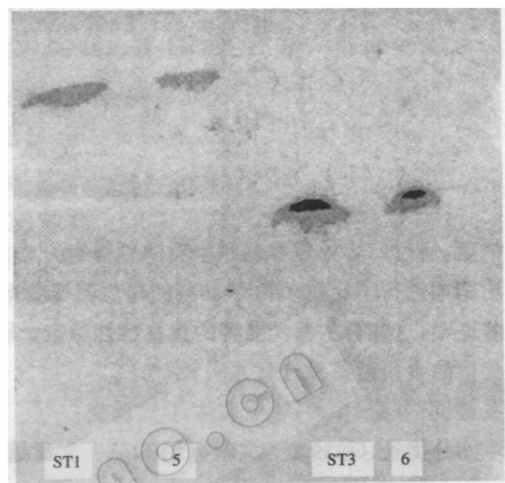


图 5 红法夫酵母色素皂化产物的 TLC 分析

5 石油醚层, 6 甲醇层, ST3 虾红素标准品,
ST1 β -胡萝卜素标准品

由生长曲线可知红法夫酵母的色素主要在对数中、后期产生, 因此色素是次级代谢产物, 与菌体生物量无关。但在生产中必须获得最大生物量以增加色素的总产量。双倍体酵母不易获得遗传稳定的诱变株。因此采用单倍体芽孢作为诱变对象。用 NTG 进行化学诱变能够得到色素产量较高的诱变株, 但要获得更好的菌株还需经过多次诱变和筛选。用冰冻-酸-热法提取红法夫酵母的色素是一种较简便有效的方法, 较酸-热法提取节约时间, 并能避免干烤过程中的色素损失。红法夫酵母产生的类胡萝卜素可能主要是虾青素及其酯和少部分 β -胡萝卜素。常用的食品抗氧化剂 BHT 能明显增强虾青素的光稳定性, 可用做酵母色素提取过程中的保护剂。

参 考 文 献

- [1] Okai Y, Higashi-Okai K. Int. J Immunopharmacol, 1996, 18(12):753~758.
- [2] 吕玉华, 徐学明, 金征宇. 中国饲料, 1998, 17:8~10.
- [3] An G H, Schuman D B, Starr M P. Appl. Environ. Microbiol, 1989, 55:116~124.
- [4] Kuhn R, Lederer E. Ber. 1933, 66b:488~495.